

Глава 3.1.11.

ЛЕЙШМАНИОЗ

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: Лейшманиоз является не обособленной болезнью, а включает разнообразие синдромов, изначально вызванных минимум 16 видами лейшмании, поражающих людей, и передающихся москитами родов *Plebotomus* и *Lutzomia*.

Лейшманиоз ограничен географическим распространением москитов-переносчиков. По всему миру было выделено пятнадцать нозогеографических структур, тринадцать из которых обладают подтвержденной или предполагаемой зоонозной природой. В последнее время значительно выросло количество регионов эндемичных по лейшманиозу. Выросло количество случаев среди животных и людей.

Описание болезни: У людей, клиническое проявление варьируется от бессимптомного течения инфекций до инфекции с высокой смертностью.

Существует описание трех классических форм болезни: висцеральной (VL), кожной (CL) и кожно-слизистой (MCL). Собаки обычно заражаются *L. infantum* и *L. chagasi* (сейчас рассматриваются как синонимы), которые вызывают хроническую висцеро-кожную болезнь у хозяина (лейшманиоз собак, CanL). Бессимптомная инфекция широко распространена у собак и способствует долговременному сохранению паразита в эндемичных регионах. Клиническое проявление и развитие лейшманиоза представляет собой последовательное взаимодействие между паразитами и иммунной реакцией хозяина. Последствие инфекции зависит от способности макрофагов хозяина эффективно уничтожать паразитов.

Идентификация возбудителя: Если у инфицированных людей и животных обнаруживаются клинические признаки и характерные поражения, то появление паразитов в окрашенных мазках селезенки, материалах костного мозга и лимфатических узлах, кожных соскобах и в тканях биопсии, позволяет поставить положительный диагноз. Если инфекция слабо выражена, выявление паразитов возможно только с помощью выделения *in-vitro* или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Так как среди разных видов существуют незначительные морфологические различия, идентификация любого выделенного организма лейшмания обуславливается биохимическими и/или молекулярными методами. Некоторые мировые центры в настоящее время используют характеристику изоэнзимы и ДНК для идентификации возбудителя.

Серологические тесты: Предпочтительно пользоваться серологическими методами для диагностики VL и CanL, даже на ранних стадиях болезни. При субклинических формах, сероположительные случаи подтверждают путем паразитологической диагностики и ПЦР. Серологические методы имеют меньшее значение для CL и MCL. Среди некоторых доступных серологических методов, наиболее подходящими считаются тест непрямой

метод флуоресцирующих антител и твердофазный иммуноферментный анализ. Неочищенные антигены для серодиагностических тестов можно подготовить в лаборатории от культивированных паразитов. Тесты, основанные на рекомбинантных антигенах, могут также применяться, и они обладают высокой специфичностью, хотя могут быть менее чувствительны.

Тесты на клеточный иммунитет: Кожный тест на лейшманиоз (LST) пригоден для определения инфекций у людей, он позволяет отличить иммунные случаи от неиммунных. Тест положителен в CL, MCL и при вылеченном VL, но отрицателен при острой форме VL. Он не имеет никакого значения для диагностики CanL. Современные тесты, позволяющие выявить цитокины, вырабатываемые лейкоцитами в ответ на стимуляцию антигена Лейшмания, демонстрируют более низкую чувствительность у пациентов с вылеченным CL по сравнению с LST.

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: В настоящее время в мире не существует эффективной доступной вакцины для собак и людей. Ряд вакцин для животных находится на стадии оценки, а три были разрешены для собак (две в Бразилии и одна в Европе). Помимо тех пунктов, которые подлежат оценке, применение этих вакцин представляет определенные сложности, как в настоящем, так и в будущем, в области диагностики, эпидемиологии и надзора за паразитами, особенно в странах, где паразит не встречается. Лейшманин больше не доступен по всему миру и нуждается в стандартизации.

А. ВВЕДЕНИЕ

Определение болезни: Лейшманиоз имеет разнообразные синдромы, вызываемые представителями простейших паразитов лейшмания (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), которые передаются млекопитающим-хозяевам через укус инфицированных mosкитов рода *Phlebotomus* (Старый Свет)¹ и *Lutzomyia* (Новый Свет). Болезнь возникает в результате размножения амастиготных форм в макрофагоцитах ретикулоэндотелиальной системы. Т-лимфоциты и цитокины играют решающую роль в определении того, вызывает ли инфекция защитный иммунный статус или болезнь будет явно прогрессировать. У инбредных моделей мышей отмечают две различные подгруппы Т-хелперов (Th): Th1 и Th2, которые отличаются по своему профилю секретируемых цитокинов посредством поляризационной активности; ответная реакция Th1 предоставляет защиту, в то время как ответная реакция Th2 предоставляет хозяина, восприимчивого к инфекции. Однако у людей и собак с клинически выраженной инфекцией, типы реакций Th1 и Th2 не имеют яркого разделения, поскольку предполагают выделение как активирующих (например, гамма интерферон, интерлейкин-12), так и сдерживающих цитокинов (например, интерлейкин-10, интерлейкин-13, интерлейкин-4, TGF бета) (Murray et al., 2005).

Возбудитель болезни: 16 признанных видов Лейшмании являются возбудителями лейшманиоза у человека. В Новом Свете *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamenis*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* и *L. amazonensis* вызывают формы, поражающие наружные покровы; *L. infantum* вызывает висцеральные или реже кожные формы. В Старом Свете *L. tropica*, *L. major* и *L. aethiopia* вызывают кожные формы; *L. infantum* и *L. donovani* вызывают висцеральные или реже

¹ В этой главе термин «Новый Свет» относится к Америке, а термин «Старый Свет» к Европе, Африке и Азии (ВОЗ, 2010).

кожные формы. С помощью генотипирования было обнаружено, что *Leishmania infantum* и *L. chagasi* идентичны, и к ним следует относиться как к синонимам (Kuhls et al., 2011). Кроме того, таксономическая позиция других возбудителей лейшманиозов форм наружного покрова (*L. kilicki* в Старом Свете; *L. рнМФА noi*, *L. garnhami* и *L. colombiensis* в Новом Свете) до сих пор находятся на рассмотрении. Другие виды лейшманиозов не являются патогенными для человека, а именно паразиты Старого и Нового Света у грызунов и возбудители кожного лейшманиоза, у рыжего кенгуру в Австралии (Dougall et al., 2011). Собак в основном поражают *L. infantum*, но в некоторых случаях у носителя были выявлены паразиты, принадлежащие к *L. braziliensis*, *L. peruviana* и *L. tropica* (Mohebbi et al., 2005; Reithinger et al., 2002).

Описание болезни: Были описаны различные клинические проявления лейшманиоза у человека, далее описанные формы разделены на три основных вида: висцеральный лейшманиоз (VL, кала-азар), кожный лейшманиоз (локализованный, распространенный или диссеминированный CL, восточная язва, ута, pian bois (гвианский кожно-слизистый лейшманиоз), кожный лейшманиоз Нового Света) и кожно-слизистый лейшманиоз (MCL, эспундия) (Всемирная организация здравоохранения, 2010). В основном перечисленные болезни являются зоонозами, кроме CL, вызванного *L. tropica* в городской местности Ближнего Востока и VL, вызванного *L. donovani* на Индийском субконтиненте (северная Индия, Непал и Бангладеш) и в некоторых частях Восточной Африки (например, Судан и Эфиопия). Лейшманиоз собак (CanL) - хроническая висцеро-кожная болезнь, вызванная *L. infantum*, для которых собаки являются резервуарами. Доля собак, обладающих резистентностью и не демонстрирующих симптомы болезни, может составить более 50% от инфицированных популяций собак. Типичными наружными признаками, зарегистрированными у восприимчивых собак, которые развиваются во время резко выраженной болезни, являются увеличение лимфатических узлов, потеря веса, эксфолиативный дерматит, алопеция, язвы и глазные патологии. В последнее время, в некоторых областях наблюдается лейшманиоз у кошек с клиническими характеристиками, напоминающими форму болезни с поражением наружных покровов, реже с системными поражениями (Gramiccia, 2011). Спорадические случаи, относящиеся к поражениям наружных покровов, были зарегистрированы у лошадей и КРС.

Зоонозные риски и требования к биобезопасности: Прямой контакт с инфицированными хозяевами или обращение с биологическими пробами и культурами паразитов от этих хозяев не требуют специальных мер предосторожности из-за москитной природы инфекций и отсутствия в окружающей среде резистентных форм. Лейшманиоз spp относится ко второй группе рисков для человека и с ней необходимо обращаться соответствующим образом, как описано в Главе 1.1.4. *Биобезопасность и биозащита: стандарты управления биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и вивариях.* Меры по биологическому сдерживанию необходимо определить на основе анализа рисков, как описано в Главе 1.1.4.

Дифференциальная диагностика: Что касается людей, то дифференциальная диагностика VL зависит от особенностей течения болезни в данной местности, связанной с эндемичными территориями. Во многих эндемичных территориях также наблюдают хроническую малярию, диссеминированный гистоплазмоз, гепатолиенальный билльгарциоз, брюшной тиф, бруцеллез, туберкулез, эндокардит, возвратный тиф и Африканский трипаносомоз. Следует также установить отличия от таких всемирно распространенных болезней, как сифилис, лимфомы, хроническая миелоидная лейкемия, саркома, злокачественный гистиоцитоз и цирроз печени. Что касается CL, то дифференциальная диагностика включает установление отличий от укусов насекомых, фурункульного миаза, бактериальной тропической язвы, келоиды, волчанки

обыкновенной, дискоидной красной волчанки и саркомы. Что касается собак, то наиболее общие признаки лейшманиоза могут быть спутаны с эрлихиозом, бабезиозом, трансмиссивным или интестинальным гельминтиазом.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Методы для диагноза лейшманиоза детально описаны ниже. Список и пригодность каждого теста для различных целей представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Методы тестов, доступные для диагностики лейшманиоза и их цели

Метод	Цель					
	Популяция свободная от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции перед перемещением	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у каждого отдельного животного или поствакцинация популяции
Идентификация возбудителя²						
Микроскопия	-	-	Не пригоден	++	-	Не пригоден
Культура in-vitro	-	+		++	-	
PCR (ПЦР)	++	+++		++	++	
Выявление иммунной реакции						
НМФА Т	++	++	Не пригоден	++	+++	Не пригоден
ELISA (ИФА)	+++	++		++	+++	
Реакция прямой агглютинации	++	++		++	++	
Иммунохроматографический экспресс-анализ	-	-		++	+	
Тесты на клеточный иммунитет	+	-		-	++	

+++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может применяться в некоторых ситуациях, оценивает надежность или другие факторы, строго ограничивающие их применение; - = не подходит для этой цели; Не пригоден = не пригоден, потому что соответствующие цели в настоящее время не имеют отношения к лейшманиозу животных. Хотя не все тесты имеют категории +++ или ++, они подвергаются формальной валидации, их естественная природа и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

PCR = полимеразная цепная реакция; НМФА Т = непрямой метод флуоресцирующих антител; ELISA - твердофазный иммуноферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

² Рекомендуется комбинация методов идентификации агентов, обращенных к некоторым клиническим пробам.

К широко применяемым методам диагностики лейшманиоза относят: клиническое обследование подозрительных случаев, паразитологическую диагностику и иммунную диагностику. Однако обнаружение паразитов является единственным способом окончательного подтверждения болезни. При VL и CL рекомендуется проводить выделение и идентификацию паразитов в биопсии (лимфатический узел, костный мозг, материал селезенки), объединенной с молекулярными и иммунодиагностическими тестами. Паразитологическая диагностика необходима для подтверждения CL (путем отскабливания поражения или пункционной биопсии с края поражения), так как ни клиническое обследование, ни серология не считаются достаточными. Мазки материала биопсии окрашивают красителем Гимза и обследуют под микроскопом при увеличении в $\times 600-1000$ для установления наличия амастиготных форм. Материал также необходимо культивировать в подходящей среде при температуре 22-26°C для микроскопического обследования промастиготных форм, которые морфологически идентичны стадиям развития, наблюдаемым у инфицированных москитов рода *Phlebotomus*.

1.1. Амастигота у человека и у млекопитающих хозяев

1.1.1. Морфологические характеристики

Амастигота представляет собой малое внутриклеточное округлое или овальное тело, размером $1.5-3 \times 2.5-6.5$ мкм, находящееся в вакуолях в пределах цитоплазмы макрофагов. Свободный жгутик отсутствует. Организм обладает относительно большим ядром и кинетопластом, содержащим палочкообразное тело и точкообразное базальное тело.

1.2. Промастигота у москитов рода *Phlebotomus* и в культурах

1.2.1. Морфологические характеристики

Промастигота представляет собой удлинённый внеклеточный организм, тело размером $15-20 \times 1.5-3.5$ мкм с одним жгутиком длиной 15-28 мкм, исходящим из расположенной впереди кинетопласты. Ядро расположено в центре.

Выбор методов выделения и культивирования будет зависеть от непосредственных обстоятельств и от технических возможностей и опыта сотрудников лаборатории (ВОЗ, 2010). Выделение *in-vitro* имеет определенные преимущества перед методами *in-vivo*: культуры становятся положительными быстрее (5-30 дней в сравнении с месяцами для появления поражений на животном) и материалы дешевле. Однако выделение *in-vitro* необходимо выполнять в строго стерильных условиях, которые маловероятны в полевых условиях. К сожалению, все еще нет «универсальной» культуральной среды, в которой было бы легко вырастить все возможные лейшмании, и считается почти невозможным предсказать, какая среда лучше подойдет для роста определенного изолята. Отдельные лаборатории должны найти наиболее подходящую среду среди двухфазных сред кровяного агара и сред культуры ткани, обогащенных эмбриональной телячьей сывороткой (Evans, 1987). При попытке первичного выделения неизвестных организмов, необходимо использовать среду, основанную на кровяном агаре – предпочтительно среду NNN (Novy, McNeil и Nicole), в ином случае необходимо использовать агаровую среду сердечно-мозгового экстракта (ВН) или ЕМТМ (среда Тоби модифицированная Эвенсом). При массовом культивировании установленных изолятов, подходящие среды регистрируют в Разделе В.1.3. ниже (см. Evans, 1987 для состава среды). Паразитов от больных с хроническими CL и MCL может быть очень трудно культивировать. Паразиты

иногда погибают во время субкультивирования, даже когда первичное выделение успешно. Весьма распространено, когда первичное выделение проводят в обогащенной среде. Часто этого можно миновать, если субкультуры приготовить в средах, менее обогащенных питательными веществами, таких как NNN, или одна из полутвердых сред (например, «скошенные среды Эванса» или полутвердый кровяной агар Локке).

Так как за последнее десятилетие было разработано несколько альтернативных методов, *in-vivo* выделение лейшманий у восприимчивых животных (например, хомяк сирийский *Mesocricetus auratus* или мышь BALB/c) больше не рекомендуется для рутинной диагностики.

Морфологическая идентификация позволяет идентифицировать лейшмании на уровне рода, но не на уровне видов или подвидов. Некоторые методы можно применять для идентификации различных видов, подвидов или штаммов лейшмании. В 2010 году в список ВОЗ были внесены 15 признанных Центров по идентификации лейшманиоза.

1.3. Характеристика изоэнзим

Известная в том числе, как мультилокусный электрофорез ферментов (MLEE), характеристика изоэнзимов представляет собой референтный метод для идентификации видов (Riox et al., 1990; ВОЗ, 2010), хотя этот метод требует культивации большого количества паразитов ($5 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$). Принципы электрофореза ферментов следующие: растворимые ферменты извлекают из организмов, выращенных в средах для массового культивирования (среда ВН1, среда MEM/FCS/EBLB [минимальная питательная среда/ эмбриональная телячья сыворотка/ кровяной бульон лизата Evan's], среда Shneider *Drosophila*). Небольшое количество экстракта затем помещают в инертную поддерживающую субстанцию, матрицу, содержащую буфер с фиксированным рН. Матрица обычно представляет собой крахмальный гель, но она в равной степени может быть абсорбирующей ацетилцеллюлозой, амидом акриловой кислоты или агарозой. рН буфера в матрице обычно выбирают таким образом, чтобы изоэнзимы были отрицательно заряжены. Прямой ток, проходящий через матрицу, несут ионы в буфере. Когда электрофорез завершается, большинство белков переместится в матрице по направлению к аноду, в зависимости от величины отрицательного заряда. Если на этой стадии происходит окрашивание общим белком, можно будет увидеть множество полос. Однако максимальный субстрат и дополнительная специфичность ферментов делает возможным окрашивать только эти белки. Следовательно, электрофорезную подвижность одного отдельного фермента можно сравнить среди нескольких организмов. Окрашенная матрица со своими окрашенными изоэнзимными полосами называется зимограмма. Обычно один или более экстрактов референтных организмов, с хорошо задокументированными паттернами образования полос фермента, включены в гель, что облегчает интерпретацию результатов. Большинство ферментов, используемых с целью составления характеристики, окрашивают методом, включающим реакцию дегидрогеназа. Необходимо обследовать, по крайней мере, 12 ферментов; организмы, демонстрирующие идентичные зимограммы, классифицируют на зимодемы определенного вида.

1.4. Методы, основанные на полимеразной цепной реакции (PCR)

Методы PCR доступны для диагностики и/или идентификации лейшманий в различных типах проб от человека и животных. В основном, методы, разработанные либо для идентификации установленных изолятов лейшмании или для выделения организмов от свежей или замороженной, фиксированной в формалине и заключенной в парафине ткани биопсии, включают: (а) процедуру переваривания материала протеиназой К и экстрактом

ДНК. Эти шаги можно также осуществлять, используя внутрилабораторные протоколы и реагенты, или с помощью широкодоступных коммерческих наборов; (b) стандартную ПЦР амплификацию с использованием олигонуклеотидных последовательностей (праймеров), взятых от малой субъединицы гена рРНК (Mathis & Deplazes, 1995), миникругов кинетопластной ДНК (Maarten et al., 1992), или других высокоповторяющихся геномных последовательностей ДНК (Bulle et al., 2002; Piarroux et al., 1993); (c) анализ амплификации продуктов с помощью 1-2% агарозного геля.

Для диагностических целей можно выполнить гнездовую или полугнездовую ПЦР с праймерами от вышеуказанных последовательностей, что позволяет увеличить чувствительность (Cruz et al., 2002). В острой форме VL у человека, ПЦР обладает чувствительностью, сравнимой с методами, основанными на культуре, но выдает результаты намного быстрее. С другой стороны, в субклинической или мягкой форме VL у человека, и у пациентов с ослабленным иммунитетом, результаты ПЦР более чувствительны, чем при любых других прямых паразитологических и серологических методах. При CanL, эффективность ПЦР диагностики по сравнению с серологией зависит от естественного развития болезни, вскоре после заражения показатели чувствительности наиболее высокие (Olivia et al., 2006; Quinnell et al., 2001). Менее инвазивные пробы, такие как конъюнктивальные смывы, были удачно проанализированы у собак (Di Muccio et al., 2012). При Американской форме CL и MCL у человека, ПЦР демонстрирует себя, как наиболее чувствительный метод по сравнению с предыдущим рекомендованным методом диагностики (De Vrujin et al., 1993).

Есть описание методы ПЦР в реальном времени, обеспечивающих продолжительный мониторинг накопления продуктов ПЦР во время амплификации (специальное оборудование имеется в продаже). Они могут быть более чувствительны, чем традиционная ПЦР, и в основном их целью является исследование кинетики инфекции и мониторинг терапевтического ответа (Bell & Ranford – Cartwright, 2002; Bossolasco et al., 2003; Reithinger & Dujardin, 2007). Кроме того, ПЦР в реальном времени показала свою пригодность для оценки инфекций в менее инвазивных пробах, таких как периферическая кровь (Francino et al., 2006).

Что касается идентификации паразитов, то были разработаны различные методики, позволяющие охарактеризовать лейшмании на уровне видов или штаммов. Например, (a) анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ПЦР (ПДРФ), в котором продукты ПЦР подвергают перевариванию с помощью подходящих рестрикционных ферментов, а полученные в результате паттерны рестрикционных фрагментов подвергаются анализу (Marfut et al., 2003; Minodier et al., 1997; Montalvo et al., 2012; Volpini et al., 2004); (b) мультилокусное секвенирование микросателлитов (MLMT) (Kuhls et al., 2011 и (c) мультилокусное секвенирование-типирование (МЛСТ) (Maricio et al., 2006). В этих случаях, ориентируются на повторяющиеся и полиморфные ДНК последовательности, такие как рибосомный внутренний транскрибируемый спейсер 1 (ITS1), цистеиновая протеаза В, миникруги кинетопластной ДНК, поверхностный гликопротеин 63, белок теплового шока 70, мини экзоны и минисателлиты (Reithinger & Dujardin, 2007; Schonian et al., 2008).

Чувствительность и специфичность большинства диагностических протоколов можно значительно увеличить с помощью гибридизации родо- или видоспецифических ДНК-зондов. Первоначально, эти зонды маркировали радиоактивными изотопами, но в настоящее время их в основном маркируют флуоресцентными красителями.

2. Серологические тесты

Для выделения антител против лейшманиоза применяют некоторые серологические тесты. Показатели чувствительности у людей, представленные ниже для каждого теста, применяются только к тем, у кого не ослаблен иммунитет. Высокий процент пациентов с VL, зараженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), были представлены как серонегативные к антителам против лейшманиоза (Gradoni et al., 1993).

2.1. Непрямой метод флуоресцирующих антител

Непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА) широко применим из-за простоты его осуществления. Тест является родоспецифичным, хотя у отдельно инфицированных *Trypanosoma cruzi* были зарегистрированы значительные перекрестные реакции. В подобных случаях, наиболее подходящими были бы серологические тесты на основе на специфичных рекомбинантных антигенов лейшмании (см. Разделы В.2.2.2. и В.2.2.4. ниже). В областях свободных от болезни Чагаса, тесты НМФА для диагностики клинических форм VL или CanL обладают чувствительностью 96% и специфичность 98%, что схоже с ИФА (ELISA) (твердофазный иммуноферментный анализ). Хотя амастиготы от замороженных срезов или мазков инфицированных органов можно использовать в качестве антигена, культивированные промастиготы представляют наиболее распространенный источник антигена.

2.1.1. Подготовка антигена

- i) Собрать 3-4 мл жидкой среды 3-дневной культуры, демонстрирующей обильный рост промастигот (см. Раздел В.1 для культурной среды).
- ii) Промыть организмы три раза в фосфатно-буферном растворе (ФБР), pH 7.2-7.4 и центрифугировать при 350 g в течение 15 минут при комнатной температуре.
- iii) Ресуспендировать итоговую клеточную массу в ФБР и вычислить концентрацию промастигот с точностью до 4×10^6 мл с помощью гемоцитометра.
- iv) Распределить 30 мкл суспензии промастиготы в каждый круг многоячейного предметного стекла и оставить для просушки при комнатной температуре.
- v) Зафиксировать промастиготы в холодном ацетоне в течение 10 минут, затем разместить предметные стекла в пластиковый контейнер и хранить в морозильнике глубокого замораживания (-35°C) не дольше 2-3 месяцев.

2.1.2. Процедура тестирования

- i) Промыть замороженные предметные стекла, покрытые антигеном, в ФБР и высушить при комнатной температуре.
- ii) Инактивировать сыворотки в течение 30 минут в водной ванне при температуре 56°C .
- iii) Подготовить двойные разведения тест-сывороток с 1/80 до 1/10.240 для VL человека, и с 1/40 до 1/5120 для CanL. Положительные и отрицательные контрольные сыворотки, в разведениях 1/80 и 1/160 для VL человека, и 1/40 и 1/80

для CanL, также включены в тест. Стандартные сыворотки не доступны, но внутренние стандарты необходимо подготовить и титровать.

- iv) Распределить 30 мкл разведенных проб сыворотки в каждый круг предметного стекла и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
- v) Энергичным промыванием переместить пробы сыворотки в ФБР, затем погрузить предметные стекла в ФБР на 10 минут. Дать предметным стеклам высохнуть.
- vi) Распределить 30 мкл иммуноглобулина конъюгированного с разведенным флуоресцеин изотиоцианатом (FITS) в каждый круг предметного стекла и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C. В продаже имеются антитела против иммуноглобулина человека и собаки, конъюгированные с FITS. Следовать инструкциям для соответствующего разведения.
- vii) Повторить этап 5 и капнуть на покровное стекло несколько капель ФБР\глицерол (50 % объем/объем каждого).
- viii) Считать результаты по предметным стеклам под флуоресцентным микроскопом. Наивысшее разведение, показывающее флуоресцентные промастиготы, считается титром антител.

2.1.3. Интерпретация результатов

При острой форме VL человека пороговая величина титра обычно находится в диапазоне от 1/80 до 1/160. Бессимптомная или субклиническая формы болезни у человека обычно показывают титры ниже 1/80. При CanL пороговая величина титра находится в диапазоне от 1/40 (указывает на воздействие, но не обязательно свидетельствует об установлении инфекции) до 1/160 (указывает на установление инфекции), при этом титр 1/320 и выше может указывать на болезнь у клинически подозрительных собак (Paltrinieri et al., 2010). Что касается других домашних млекопитающих животных (например, кошек), то стандартизированных пороговых величин нМФА нет. Так как проведение тестов нМФА в различных лабораториях может варьироваться, для каждой лаборатории лучше определить собственную пороговую величину титра, используя определенные положительные и отрицательные референтные сыворотки.

2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА можно проводить на сыворотке и на отмеренном объеме крови. Кровь собирают концом иглы на подходящие абсорбирующие бумажные полоски и дают ей высохнуть. Пробы извлекают из адсорбента и тестируют в однократном разведении, которое по заранее проведенной оценке выдает допустимую чувствительность и специфичность. Подобный тест можно применять для сероэпидемиологических наблюдений в полевых условиях.

В классическом методе антиген подготавливают следующим образом: промастиготы, собранные из культур, промывают четыре раза в ФБР, рН 7.2, при 1000 g в течение 15 минут. Наполненные промастиготы ресуспендируют в дистиллированной воде, объем которой в два раза превышает их объем, затем разрушают ультразвуком при средней амплитуде в ледяной ванне. Суспензию оставляют при температуре 4°C на всю ночь для того, чтобы позволить белкам выйти в раствор. После итогового центрифугирования при 4000 g в течение 10 минут для удаления остатков разрушенных клеток, внешний слой,

представляющий собой концентрированный растворимый антиген, распределяют по флаконам и хранят при температуре -20°C до тех пор, пока они не потребуются. В данном тесте его разводят с ФБР до заданной оптимальной концентрации белка (около 20 мкг/мл), как было измерено по методу Лоури. Реагенты, конъюгированные с ферментом (обычно пероксидаза хрена), содержат козы иммуноглобулины против собак или белок А (Namarshah et al., 2012).

ИФА пригодна для диагностики лейшманиоза Старого и Нового Света. Существует небольшая или вообще отсутствует перекрестная реакция с другими болезнями, и в зависимости от используемого штамма лейшмании, чувствительность может находиться в диапазоне от 86% до 99%.

Для диагностики CanL в ИФА вместо неочищенного лизата применяют растворимый в детергенте антиген промастиготы. В качестве детергента использовали Triton X-100, а белковый экстракт был защищен ингибиторами протеазы. Используя этот метод, чувствительность ИФА увеличилась до 99.5%, а специфичность была сравнима со специфичностью теста НМФА (97%) (Mancianti et al., 1995).

Методы ИФА, описанные выше, основываются на неочищенных антигенных препаратах. Во время ИФА рекомбинантный антиген от клонированного белка *L. infantum*, называемый гК39, показал высокую реактивность к сывороткам человека и собак, пораженных висцеральным лейшманиозом.

При использовании 25-50 нг антигена для собак с подтвержденной паразитологической болезнью специфичность и чувствительность составили 99% (Scalone et al., 2002). У ВИЧ положительных пациентов, К39 ИФА показывает более высокую чувствительность (82%), чем тест НМФА (54%) (Houghton et al., 1998). Антиген К39, демонстрирующий существенную стабильность и воспроизводимость, имеется в продаже. В последнее время, химерный рекомбинантный антиген К9-К39-К26 признали единым ИФА протоколом для серологической диагностики лейшманиоза у человека и у собак (Dapra et al, 2008). В отношении собак, специфичность и чувствительность теста были зарегистрированы на отметках 99.5% и 98.5%, соответственно с высоким коэффициентом соответствия (значение К: 0.98) со стандартным тестом НМФА.

2.3. Реакция прямой агглютинации (РА)

Реакция прямой агглютинации (РА) была описана для диагностики VL и CanL. После доработки теста, РА была валидирована, как специфичный и чувствительный анализ для полевых исследований (Voelaert et al., 1999; Cardoso et al., 2004; Ozbel et al., 2000). Антиген содержит собранные от культур промастиготы, промытые в ФБР, pH 7.2, обработанные 0.4 % трипсина (в течение 45 минут при температуре 37°C и затем снова промытые) и окрашенные в 0,02% кумасси бриллиантовом синем.

Двойную серию разведений сыворотки в ФБР проводят в лунках титрационного микропланшета с V-образным дном; 50 мкл препарата антигена добавляют в каждую лунку, затем планшет осторожно встряхивают руками и оставляют при комнатной температуре в течение 18 часов. Результаты теста считывают визуально напротив белого фона. Типичные голубые скопления указывают на положительные реакции, в то время как отрицательные пробы дают синее пятно с четкими краями.

Модифицированная РА для выделения специфичных антител к лейшмании у хозяев-резервуаров семейства собачьих считается весьма подходящей для широкого спектра

эпидемиологической и экологической полевой работы и диагностики CanL, обладая 100% чувствительностью и 98.9% специфичностью (Harith et al., 1988; 1989). Надежность теста была улучшена за счет обработки тест-сывороток 0.2 М 2-меркаптоэтанолом и их последующей инкубации при температуре 37°C.

2.4. Иммунохроматографический экспресс анализ (тест метод с индикаторной полоской)

Иммунохроматографический экспресс анализ с использованием гК39 в качестве антигена (в продаже имеется индикаторная полоска К39) был оценен в различных эндемических условиях возникновения VL. Нитроцеллюлозная мембрана тест-набора снабжена гигроскопической прокладкой с одного конца, полоской иммобилизованного антибелкового антитела А (используемого для выделения иммуноглобулина) с другого (участок контроля), и полоской антигена гК39 в середине (участок тестирования). Конъюгат коллоидного золота с белком А используют как реагент иммунохроматографического выделения. Одну маленькую каплю (20 мкл) сыворотки для исследования размещают на гигроскопическую прокладку перед тем, как на прокладку добавляют две большие капли (100 мкл) тест-буфера, и позволяют смеси перемещаться вверх по полоске по средствам капиллярного воздействия. Через 2-10 минут результат оценивают, как положительный, если появляются две четкие красные линии (одна на участке тестирования, а другая на участке контроля), результат считают отрицательным, если на участке тестирования не появляется ни одной красной линии, и тест считают недействительным, если контрольные линии не появляются вообще.

При клинических формах VL у человека, две торговые марки по производству индикаторных полосок К39 продемонстрировали 99-100% чувствительность и 95-100% специфичность в Индии (Sundar et al., 2006), 90% чувствительности и 100% специфичность в Бразилии (Carvalho et al., 2003), и 100% чувствительность и специфичность в Средиземноморском бассейне (Brandonisio et al., 2002). В подтвержденных случаях CanL, как в бессимптомных, так и при наличии симптомов, чувствительность индикаторных полосок К39 составила 97%, а специфичность 100% (Otranto et al., 2005).

3. Тест на клеточный иммунитет

Замедленная гиперчувствительность - важная отличительная особенность всех форм лейшманиоза человека и ее можно измерить с помощью кожного теста на лейшманин (LST), известного также как реакция Монтенегро (Manson – Bahr, 1987). LST не играет никакого значения для диагностики CanL. Лейшманин - суспензия убитых целых ($0.5-1 \times 10^7$ /мл) или разрушенных (250 мкг белок/мл) промастигот в апиrogenном солевом растворе, содержащим фенол. Развивается поздняя реакция, результаты которой считывают через 48-72 часа. Показатель ложноположительной реакции у здоровых людей составляет приблизительно 1%, но он может быть выше в областях, где уже есть история появления лейшманиоза, так как многие здоровые популяции могут показывать достаточно высокие уровни чувствительности к лейшманиозу. Хотя среди всех штаммов лейшмании существует полная перекрестная реактивность, гетерологичные антигены часто дают менее выраженные реакции, которые могут быть вызваны трудностью стандартизации.

LST применяют для клинической диагностики CL и MCL. При VL тест измерит только прошлые инфекции, потому что во время активной стадии заболевания наблюдают полное

отсутствие реакции организма на возбудителя. Лейшманин не доступен в продаже по всему миру.

В последнее время, измерения гамма интерферона (IFN- γ) как суррогатного маркера клеточного иммунного ответа были опробованы при лейшманиозе человека с использованием формата, схожего с тем, что применяется для туберкулеза, используя ИФА для измерения цитокина, выделенного лейкоцитами в ответ на стимуляцию антигена лейшмании (Alimohammadian et al., 2012; Turgay et al., 2010).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

1. Вакцины

1.1. Общие положения

В мире нет эффективной вакцины для профилактической иммунизации против лейшманиоза. Ранее вакцинация против Лейшмании ограничивалась защитой людей от *L. tropica* и *L. major* с помощью заражения через инъекцию организмами *L. major*. Живые промастиготы из культур вводили шприцом в предплечье, давая инфекции развиваться естественным путем.

После выздоровления у человека вырабатывался устойчивый иммунитет к последующей инфекции обоих видов лейшмании. Этот тип иммунизации практиковали в ограниченном районе гиперэндемичных областей CL (в связи с *L. major*) в Израиле, Иране и в бывших республиках СССР (Shuikina et al., 1968).

1.2. Основные принципы производства и минимальные требования к вакцинам

В настоящее время не существует доступных произведенных в лаборатории антигенов для производства вакцины против лейшмании. Существует три лицензированных, запатентованных инактивированных вакцины против CanL. Первая вакцина была разработана в Бразилии. Основные принципы и требования к производству были одобрены Министерством сельского хозяйства, животноводства и снабжения Бразилии. Вакцина содержит обогащенную гликопротеином фракцию *L. donovani*, известную как “фукозно-маннозный лиганд” (FML).

Полевые исследования показывают около 80% клинической защиты, обеспеченной антигеном, введенным с QuilA сапонином в качестве адъюванта и так же хорошую иммунотерапевтическую эффективность во время применения на больных собаках (Palatnik-de-Sousa et al., 2008). Вторую вакцину также разработали в Бразилии, в ней используется рекомбинантный антиген A2 *L. donovani* совместно с адъювантом сапонины. Вакцина обеспечивает 43% защиты в положительных культурах при искусственной модели контрольного заражения. Третья вакцина лицензирована в Европе. Основные принципы и требования к производству были одобрены Европейским агентством лекарственных средств. Антиген содержит выведенные/выделенные белки, очищенные от безбелковой среды, используемой для выращивания промастигот *L. infantum*, к которым в качестве адъюванта добавляют сапонином QA-21 (Moreno et al., 2012). Оценка полевой эффективности этой коммерческой вакцины все еще находится на предварительной стадии. Данные по 80 собакам породы бигль, которых подвергали воздействию

естественной инфекции в течение 2 лет, указывают на то, что вакцина снижает риск развития прогрессивного заболевания почти в четыре раза, но не предотвращает инфекцию (Oliva et al., 2012). Программы по надзору, особенно те, которые основываются исключительно на серологии у собак, необходимо переработать с учетом воздействия вакцинации и следует обеспечить надлежащую интерпретацию эпидемиологических данных.

В настоящее время, ряд перспективных вакцин против лейшманиоза находится в процессе экспериментальной оценки (Coler & Reed, 2005; Das & Ali, 2012). Химерный антиген от трех рекомбинантных антигенов лейшмании, отобранных по их способности вызывать клеточные иммунные ответы (известные как Leish-111f, защищенный патентом), с добавлением в качестве адъюванта монофосфорил-липида А – устойчивой эмульсии (MPL-SE), представляет первую сформулированную вакцину против лейшманиоза у человека, полностью прошедшую 1 и 2 фазы тестирования на безопасность и иммуногенность на здоровых субъектах.

Тот же полипротеиновый антиген и адъювант не могут защитить собак от инфекции *L. infantum* на 3-ей фазе испытания (Gradoni et al., 2005), однако они обеспечивают защиту от болезни, когда используются в качестве иммунотерапевтического агента на собаках с легкой формой CanL (Trigo et al., 2010). В последнее время был обнаружен новый гибридный антиген, образованный от четырех рекомбинантных антигенов (KSAC, защищенный патентом). Он оказался перспективным для защиты от VL человека и CanL (Goto et al., 2011).

2. Диагностические биологические препараты (антигены для теста кожи)

Поскольку кожный тест не используется для диагностики инфекции у животных, а антиген лейшманина не был международно стандартизирован, то МЭБ не может предоставить рекомендации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ALIMOHAMMADIAN M.H., JONES S.L., DARABI H., RIAZIRAD F., AJDARY S., SHABANI A., REZAEI M.A., MOHEBALI M., HOSSEINI Z. & MODABBER F. (2012). Assessment of interferon- γ levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87 (1), 70–75.
- BELL A.S. & RANFORD-CARTWRIGHT L.C. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.*, 18 (8), 337–342.
- BOELAERT M., EL SAFI S., JACQUET D., DE MUYNCK A., VAN DER STUYFT P. & LE RAY D. (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60, 129–134.
- BOSSOLASCO S., GAIERA G., OLCINI D., GULLETTA M., MARTELLO L., BESTETTI A., BOSSI L., GERMAGNOLI L., LAZZARIN A., UBERTI-FOPPA C. & CINQUE P. (2003). Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (11), 5080–5084.
- BRANDONISIO O., FUMAROLA L., MAGGI P., CAVALIERE R., SPINELLI R. & PASTORE G. (2002). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 461–464.
- BULLE B., MILLON L., Bart J.M., GALLEGO M., GAMBARELLI F., PORTUS M., SCHNUR L., JAFFE C.L., FERNANDEZBARREDO S., ALUNDA J.M. & PIARROUX R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3391–3397.
- CARDOSO L., SCHALLIG H.D., NETO F., KROON N. & RODRIGUES M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.*, 91, 95–100.
- CARVALHO S.F., LEMOS E.M., COREY R. & DIETZE R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68, 321–324.
- COLER R.N. & REED S.G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, 21, 244–249.

COLER R.N., GOTO Y., BOGATZKI L., RAMAN V. & REED S.G. (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect. Immun.*, 75, 4648–4654.

CRUZ I., CAÑAVATE C., RUBIO J. M., MORALES M.A., CHICHARRO C., LAGUNA F., M. JIMÉNEZ-MEJÍAS, SIRERA G., VIDELA S., ALVAR J. & THE SPANISH HIV-LEISHMANIA STUDY GROUP. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96 (Suppl 1), S185–S189.

DAPRÀ F., SCALONE A., MIGNONE W., FERROGLIO E., MANNELLI A., BIGLINO A., ZANATTA R., GRADONI L. & ROSATI S. (2008). Validation of a recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *J. Immunoassay Immunochem.*, 29, 244–256.

DAS A. & ALI N. (2012). Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Front. Immunol.*, 3, 99.

DE BRUJIN M.H.L., LABRADA L.A., SMYTH A.J., SANTRIC C. & BARKER D.C. (1993). A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop. Med. Parasitol.*, 44, 201–207.

DI MUCCIO T., VERONESI F., ANTOGNONI M.T., ONOFRI A., PIERGILI FIORETTI D. & GRAMICCIA M. (2012). Diagnostic value of conjunctival swab nested-PCR in different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 50 (8), 2651–2659.

DOUGALL A.M., ALEXANDER B., HOLT D.C., HARRIS T., SULTAN A.H., BATES P.A., ROSE K. & WALTON S.F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int. J. Parasitol.*, 41 (5), 571–579.

EVANS D.A. (1987). *Leishmania*. In: *In-Vitro Methods for Parasite Cultivation*, Taylor A.E. & Baker J.R., eds. Academic Press, London, UK, 52–75.

FRANCINO O., ALTET L., SANCHEZ-ROBERT E., RODRIGUEZ A., SOLANO-GALLEGO L., ALBEROLA J., FERRER L., SANCHEZ A. & ROURA X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 137 (3-4), 214–221.

GOTO Y., BHATIA A., RAMAN V.S., LIANG H., MOHAMATH R., PICONE A.F., VIDAL S.E., VEDVICK T.S., HOWARD R.F. & REED S.G. (2011).

KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 18, 1118–1124.

GRADONI L., FOGLIA MANZILLO V., PAGANO A., PIANTEDOSI D., DE LUNA R., GRAMICCIA M., SCALONE A., DI MUCCIO T. & OLIVA G. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, 23 (45), 5245– 5251.

GRADONI L., SCALONE A. & GRAMICCIA M. (1993). HIV-Leishmania co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87, 94–96.

GRAMICCIA M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and antivectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.*, 181, 23–30.

HAMARSHEH O., NASEREDDIN A., DAMAJ S., SAWALHA S., AL-JAWABREH H., AZMI K., AMRO A., AREKAT S., ABDEEN Z. & AL-JAWABREH A. (2012). Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. *Parasit. Vectors*, 5, 183.

HARITH A.E., KOLK A.H.J., LEEUWENBURGH J., MUIGAI R., HUIGEN E., JELSMA T. & KAGER P.A. (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1321–1325.

HARITH A.E., SLAPPENDEL R.J., REITER I., VAN KNAPEN F., KORTE P.D., HUIGEN E. & KOLK A.H.J. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2252–2257.

HOUGHTON R.L., PETRESCU M., BENSON D.R., SKEIKY Y.A.W., SCALONE A., BADARO R., REED S.G. & GRADONI L. (1998). A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.*, 177, 1339–1344.

KUHLS K., ALAM M.Z., CUPOLILLO E., FERREIRA G.E., MAURICIO I.L., ODDONE R., FELICIANGELI M.D., WIRTH T., MILES M.A. & SCHÖNIAN G. (2011). Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5 (6), e1155.

MAARTEN H.L., DE BRUJIN M.H.L. & BARKER D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, 52, 45–58.

MANCIANTI F., FALCONE M.L., GIANNELLI C. & POLI A. (1995). Comparison between and enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 59, 13–21.

MANSON-BAHR P.C. (1987). Diagnosis. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Vol. II. Clinical Aspects and Control, Peters W. & Killick-Kendrick R., eds. Academic Press, London, UK, 703–729.

MARFURT J., NASEREDDIN A., NIEDERWIESER I., JAFFE C.L., BECK H.P. & FELGER I. (2003). Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3147–3153.

MATHIS A. & DEPLAZES P. (1995). PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1145–1149.

MAURICIO I.L., YEO M., BAGHAEI M., DOTO D., PRATLONG F., ZEMANOVA E., DEDET J.P., LUKES J. & MILES M.A. (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int. J. Parasitol.*, 36, 757–769.

MINODIER P., PIARROUX R., GAMBARELLI F., JOBLET C. & DUMON H. (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2551–2555.

MOHEBALI M., HAJJARAN H., HAMZAVI Y., MOBEDI I., ARSHI S., ZAREI Z., AKHOUNDI B., NAEINI K.M., AVIZEH R. & FAKHAR M. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.*, 129, 243–251.

MONTALVO A.M., FRAGA J., MAES L., DUJARDIN J-C. & VAN DER AUWERA G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCR for global *Leishmania* species identification. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31, 1453–1461.

MORENO J., VOULDOUKIS I., MARTIN V., MCGAHIE D., CUISINIER A.M. & GUEGUEN S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an

appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6 (6), e1683.

MURRAY H.W., BERMAN J.D., MARTIN V., DAVIES C.R. & SARAVIA N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366, 1561-1577.

OLIVA G., NIETO J., FOGLIA MANZILLO V., CAPPIELLO S., FIORENTINO E., DI MUCCIO T., SCALONE A., MORENO J., CHICHARRO C., BUTAUD T., GUEGAND L., MARTIN V., CUISINIER A-C., GUEGUEN S., CAÑAVATE C. & GRADONI L. (2012). Evidence for protection against active infection and disease progression in naïve dogs vaccinated with LiESP/QA21 (CaniLeish®) exposed to two consecutive *Leishmania infantum* transmission seasons. Proceedings of the WSAVA / FECAVA / BSAVA (World Small Animal Veterinary Association / Federation of European Companion Animal Veterinary Associations / British Small Animal Veterinary Association) World Congress, Birmingham, UK, 11–15 April 2012, p. 529–530.

OLIVA G., SCALONE A., FOGLIA MANZILLO V., GRAMICCIA M., PAGANO A., DI MUCCIO T. & GRADONII L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and Nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, 44 (4), 1318–1322.

OTRANTO D., PARADIES P., SASANELLI M., LEONE N, de CAPRARIIS D., CHIRICO J., SPINELLI R., CAPELLI G. & BRANDONISIO O. (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17, 32–37.

OZBEL Y., OSKAM L., OZENSOY S., TURGAY N., ALKAN M.Z., JAFFE C.L. & OZCEL M.A. (2000). A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop.*, 74, 1–6.

PALATNIK-DE-SOUSA C.B., BARBOSA ADE F., OLIVEIRA S.M., NICO D., BERNARDO R.R., SANTOS W.R., RODRIGUES M.M., SOARES I. & BORJA-CABRERA G.P. (2008). FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second generation to synthetic vaccine. *Expert Rev. Vaccines*, 7, 833–851.

PALTRINIERI S., SOLANO-GALLEGO L., FONDATI A., LUBAS G., GRADONI L., CASTAGNARO M., CROTTI A., MAROLI M., OLIVA G., ROURA X., ZATELLI A. & ZINI E. (2010). Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 236 (11), 1184–1191.

PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A.M., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H. & QUILICI M. (1993). Isolation

and characterization of a repetitive DNA sequence for *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49, 364–369.

QUINNELL R.J., COURTENAY O., DAVIDSON S., GARCEZ L., LAMBSON B., RAMOS P., SHAW J.J., SHAW M.A. & DYE C. (2001). Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, 122, 253–261.

REITHINGER R. & DAVIES C.R. (2002). American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96 (Suppl 1), S123–126.

REITHINGER R. & DUJARDIN J-C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 21–25.

RIOUX J.A. LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PERIERES J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*, use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 111–125.

SCALONE A., DE LUNA R., OLIVA G., BALDI L., SATTÀ G., VESCO G., MIGNONE W., TURILLI C., MONDESIRE R.R., SIMPSON D., DONOGHUE A.R., FRANK G.R. & GRADONI L. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, 104, 275–285.

SCHÖNIAN G., MAURICIO I., GRAMICCIA M., CAÑAVATE C., BOELAERT M. & DUJARDIN J-C. (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol.* 24, 135–142.

SHUIKINA E.E., SERGIEV V.P., TRIERS I.I., SHCHERBAKOV V.A. & DIVEEV S.KH. (1968). Experience of antileishmaniasis vaccination with cultures of *Leishmania tropica* major grown in various types of media. *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 37, 648–651 (in Russian).

SUNDAR S., MAURYA R., SINGH R.K., BHARTI K., CHAKRAVARTY J., PAREKH A., RAI M., KUMAR K. & MURRAY H.W. (2006). Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 251–253.

TRIGO J., ABBEHUSEN M., NETTO E.M., NAKATANI M., PEDRAL-SAMPAIO G., DE JESUS R.S., GOTO Y., GUDERIAN J., HOWARD R.F. &

REED S.G. (2010). Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. *Vaccine*, 28, 3333–3340.

TURGAY N., BALCIOGLU I.C., TOZ S.O., OZBEL Y. & JONES S.L. (2010). Quantiferon-Leishmania as an epidemiological tool for evaluating the exposure to Leishmania infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83, 822–824.

VOLPINI A.C., PASSOS V.M., OLIVEIRA G.C. & ROMANHA A.J. (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.*, 90, 31–37.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2010). Control of the leishmaniases, WHO Technical Report Series 949, WHO, Geneva, Switzerland, 1–186.